

## ANTIGENISITAS DAN IMUNOGENISITAS *Salmonella enteritidis*: IMPLIKASINYA DALAM DIAGNOSIS DAN PENGEMBANGAN VAKSIN ISOLAT LOKAL UNTUK UNGGAS

TATI ARIYANTI dan SUPAR

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. R.E. Martadinata No. 30, Bogor 16114

(Makalah diterima 29 Agustus 2008 – Revisi 28 Nopember 2009)

### ABSTRAK

Bakteri genus *Salmonella* terdiri dari banyak serovar, jumlahnya mencapai lebih dari 2.400 serovar yang diidentifikasi secara serologik berdasarkan variasi antigen somatik (O), flagela (H) dan kapsul (Vi). Serovar yang dapat menimbulkan penyakit pada hewan relatif sedikit, yaitu: *S. pullorum* dan *S. gallinarum* pada unggas, menyebabkan *fowl typhoid*; *S. choleraesuis* menginfeksi babi, *S. typhimurium* dan *S. enteritidis* menginfeksi semua jenis hewan ternak dan manusia. *S. typhimurium* dan *S. enteritidis* diisolasi dari berbagai kasus salmonellosis unggas, produk daging, susu, telur dan produk-produknya, yang cenderung menunjukkan peningkatan prevalensinya dalam dua dekade terakhir termasuk di Indonesia. Serovar *Salmonella* yang bersifat patogenik menginfeksi hewan atau manusia, mengkolonisasi mukosa usus dan menyebabkan diare. Bakteri *Salmonella* dapat menembus mukosa usus masuk ke dalam sirkulasi darah atau limfatik dan dapat menimbulkan respon kekebalan humoral dan selular. Bakteri dapat bertahan dalam jaringan limfoglandula, dapat menimbulkan bahaya infeksi laten dan menyebar ke lingkungan. Diagnosis salmonellosis pada hewan dapat dilakukan dengan serologik antara lain: aglutinasi serum atau *whole blood agglutination test* dan ELISA antibodi dengan menggunakan antigen ekstrak *whole cell* atau LPS, tetapi masih menimbulkan reaksi silang. ELISA antibodi dengan antigen *fimbria* SEF14 bersifat spesifik untuk uji infeksi *S. enteritidis*. Penggunaan vaksin inaktif *S. enteritidis* dapat menimbulkan respon kekebalan humoral yang tinggi dan memberikan proteksi terhadap bakteri penantang yang homolog dan bakteri yang termasuk dalam satu grup (D). Hal ini tidak menimbulkan *secretory* antibodi pada mukosa usus dan *cell mediated immunity* (CMI) *response*. Penggunaan vaksin inaktif *S. enteritidis* isolat lokal yang berdasarkan serotipe lapangan dapat dipakai untuk menurunkan penularan salmonellosis secara vertikal, dan meningkatkan keamanan pangan asal unggas untuk konsumsi manusia.

**Kata kunci:** *Salmonella enteritidis*, antigenisitas, imunogenisitas, diagnosis, vaksin untuk unggas

### ABSTRACT

#### ANTIGENICITY AND IMMUNOGENICITY OF *Salmonella enteritidis*: ITS IMPLICATION FOR DIAGNOSIS AND DEVELOPMENT OF LOCAL ISOLATE VACCINE FOR POULTRY

Genus *Salmonella* consists of more than 2,400 serovars, which can be identified by means of serological method based on the variation of their somatic (O), flagellar (H) and capsular antigens (Vi). *Salmonella* serovars which are able to cause disease in animal or domestic animal are limited, such as: *S. pullorum* and *S. gallinarum* which are well adapted to poultry, cause fowl typhoid, *S. choleraesuis* causes disease in swine. *S. typhimurium* and *S. enteritidis* can infect all animals and humans. *S. typhimurium* and *S. enteritidis* could be isolated from salmonellosis of poultry, meat, milk and eggs. The prevalence of those isolates within the last two decades tends to increase. Pathogenic *Salmonella* serovars can infect both animals and humans, colonize the intestinal epithelial cells lead to diarrhoea. *Salmonella* spp. may enter the lower layer of epithelial cells and the lymphoid vascular system. Humoral antibody and cell mediated immunity responses may develop. Extraintestinal shedding or dissemination of *Salmonella* spp. may occur and multiply, this may cause latent infections and spread to the environment. Serologic diagnosis of infected animals can be done by means of serum or whole blood agglutination tests with whole cell antigen or ELISA with LPS coated tray, might demonstrate cross reactions among serovars within the one group. ELISA antibody by using fimbrial SEF14 antigen demonstrated specific diagnosis of *S. enteritidis* infection. The use of *S. enteritidis* inactive vaccines stimulates high humoral antibody response and protection against challenged homologous serovar within one group (D). The secretory antibody in mucosal surface of intestine and cell mediated immunity were not stimulated after vaccination with inactive *Salmonella* vaccine. Inactive vaccines (local isolate of *S. enteritidis*) which was developed and evaluated on experimental layer chicken produced protection against challenged homologous and may be used to control vertical transmission salmonellosis through eggs and can be used to improve the safety of animal food products for human consumption.

**Key words:** *Salmonella enteritidis*, antigenicity, immunogenicity, diagnosis, vaccines for poultry

## PENDAHULUAN

Antigen somatik *S. enteritidis*, *S. pullorum* dan *S. gallinarum* mempunyai banyak persamaan, semuanya digolongkan dalam kelompok serogrup D (EWINGS, 1986). *S. pullorum* telah diketahui menyebabkan penyakit pada unggas dan dianggap penting pada industri perunggasan. Penyakit pulorum tersebar luas di berbagai belahan dunia termasuk di Indonesia (POERNOMO, 1978; OLIVEIRA *et al.*, 2004). Serovar *S. pullorum* menyebabkan infeksi yang bersifat enterik dan atau sistemik sehingga dapat menimbulkan respon antibodi humoral dengan titer tinggi yang dapat dideteksi dengan serum aglutinasi atau *whole blood* aglutinasi (POERNOMO dan HARDJOUTOMO, 1977; OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Infeksi *S. enteritidis* pada ternak di Indonesia khususnya ternak unggas dalam kurun waktu dua dekade terakhir ini dilaporkan cenderung meningkat berdasarkan hasil isolasi dan *serotyping* (POERNOMO, 2000; 2004), namun demikian data lengkap tentang prevalensi dan penyebaran infeksi *S. enteritidis* pada ayam baik dengan serologik maupun kultural belum banyak diketahui. Infeksi *S. enteritidis* pada industri perunggasan dipandang sangat penting dari aspek kesehatan masyarakat veteriner, karena adanya transmisi bakteri secara vertikal melalui telur (TIMONEY *et al.*, 1989; MC DONOUGH *et al.*, 1998). Menurut laporan dari negara-negara di Eropa dan Amerika dilaporkan bahwa infeksi *fowl salmonellosis* yang berkaitan dengan aspek kesehatan masyarakat veteriner mendapat perhatian secara khusus terutama dalam diagnosis penyakit. Keberhasilan dalam deteksi infeksi *S. enteritidis* pada ayam di dalam flock dan transmisi bakteri melalui telur telah dilaporkan oleh MC DONOUGH *et al.* (1998). Hal serupa dilaporkan juga di Indonesia, bahwa *S. enteritidis* dapat diisolasi dari telur-telur yang dijual di pasar di daerah Bogor (KUSUMANINGSIH, 2007).

Konfirmasi diagnosis infeksi *S. pullorum* dan *S. enteritidis* secara laboratorik dapat dilakukan dengan metode *tube agglutination* menggunakan antigen LPS (ekstrak dinding sel), karena kedua serovar bakteri tersebut tergolong dalam serogrup D dan memiliki *sharing* antigen somatik 9 dan 12. Dengan demikian, penggunaan antigen berwarna pulorum pada uji serologis darah ayam dapat mendeteksi reaksi silang antibodi IgM atau IgG terhadap *S. pullorum* dan *S. enteritidis*. IgM antibodi hanya terdeteksi pada infeksi awal, sedangkan IgG berada di tubuh hospes dalam jangka waktu yang lama (CHART *et al.* 1990; POERNOMO dan HARDJOUTOMO, 1981). Dari aspek pelaksanaan pengujian di laboratorium dilaporkan bahwa terdapat hubungan reaksi lemah (*clumping*) pada serum *plate test* untuk deteksi antibodi somatik (dinding sel) dan deteksi *S. enteritidis* sampel yang

positif dengan kultur. Oleh karena itu, terdapat asumsi hasil uji yang kurang benar pada penggunaan antigen pulorum untuk diagnosis pulorum (KIM *et al.*, 1991). Dengan demikian uji serum aglutinasi menggunakan *whole cell* antigen (antigen pulorum) masih mempunyai kelemahan atau tidak spesifik yaitu reaksi silang antibodi dari berbagai serogrup bakteri *Salmonella* spp. Sebagai contoh serogrup B serovar *S. typhimurium sharing* antigen somatik 1, 12 dan di antara serogrup D serovar *S. typhi*, *S. gallinarum* dan *S. enteritidis sharing* antigen somatik 9,12. Disamping itu, masih terdapat lebih dari 38 serovar *Salmonella* spp, yang memiliki persamaan antigen somatik (O<sub>9</sub>) (EWINGS, 1986).

Respon antibodi terhadap antigen flagela gm dari *S. enteritidis* terbentuk lebih awal dibandingkan dengan respon antibodi terhadap antigen somatik dan mencapai titik puncak lebih awal, dan 10 minggu berikutnya menjadi kebalikannya (MC DONOUGH *et al.*, 1998). Disamping itu, penggunaan antigen flagela gm tidak menimbulkan reaksi silang serovar *Salmonella* sp. dalam grup D sehingga dapat membedakan infeksi *S. enteritidis* terhadap serogrup yang lain (ARIYANTI dan SUPAR, 2007). Pada kesempatan ini dikemukakan suatu kajian retrospektif tentang aspek antigenisitas dan imunogenisitas *S. enteritidis* dan implikasinya dalam diagnosis dan pengembangan vaksin isolat lokal untuk unggas.

## DIVERSITAS ANTIGEN *Salmonella* spp.

Antigen *Salmonella* terdiri dari tiga jenis antigen utama, yaitu antigen somatik (O), antigen kapsul (Vi) dan antigen flagela (H) (EWINGS, 1986; GRIMONT *et al.*, 2000). Sistem diferensiasi *serotyping* antigen tersebut mengacu pada "Kauffman-White scheme" (POPOFF *et al.*, 1998). Struktur antigen O sangat beragam terdiri dari berbagai jenis lipopolisakarida (LPS). Rantai utama LPS mengandung 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid, lipid A, L-glycero-D-manno-heptose, D-glukosa, D-galaktosa, N-acetil glucosamin dan *ethanolamine pyrophosphatase*. Dari struktur rantai utama terdapat rantai bercabang menuju permukaan sel. Cabang poli-O terdiri dari rantai monomer yang mengandung D-galaktosa, L-rhamnosa, D-manosa, dan pada beberapa serogrup mengandung abequose membentuk faktor O<sub>4</sub> dalam kelompok serogrup B, *paratose* dalam serogrup A atau *tyvelose* (membentuk faktor 9 dalam serogrup D) pada posisi 1-3 D-manosa (JIANG *et al.*, 1991).

Faktor antigenik-O mudah berubah karena mutasi dengan perantara bakteriofag atau dikendalikan oleh plasmid. Pada tahun 1988 sudah mencapai 2.449 serovar yang terdaftar dalam White-Kauffman Le Minor (WKL) *scheme*, 1.443 serovar dalam grup *S. enterica*, dan 20 dalam grup *S. bongori*. Dari 1.443

serovar yang termasuk dalam subspecies *enterica*, 488 diantaranya termasuk dalam subspecies *salamae*, 94 termasuk subspecies *arizonae*, 323 subspecies *diarizonae*, 70 termasuk subspecies *houtenae* dan 11 termasuk dalam subspecies *indica*. Namun demikian dalam praktek *serotyping* jumlah serovarnya sangat terbatas (POPOFF *et al.*, 1998).

Antigen kapsular (Vi) merupakan polisakarida yang ditemukan pada serovar *typhi*, *paratyphi C* dan *dublin*. Antigen tersebut dikendalikan oleh 3 gen yang terletak pada loki *viaA*, *viaB*, *ompB*. Loki *viaA*, dan *ompB* terdapat dalam berbagai spesies dan genus lain sebagai regulator dalam sintesis antigen Vi. Sedangkan *viaB* hanya terdapat dalam spesies (*Salmonella* spp.) yang mempunyai kemampuan produksi Vi, mempunyai gene sintesis protein, berfungsi sebagai *exportation polisaccharide* dan dapat membentuk antigen kompleks lipopolisakarida (*lipid-protein* dan polisakarida) (RUBIN *et al.*, 1985).

Antigen H terdapat dalam flagela, terdiri dari protein subunit yang dinamakan flagelin. Antigen H pada *Salmonella* sp. bersifat dua fase (bifase). Sintesis antigen ini dikendalikan oleh dua sistem gen yang terletak terpisah dalam kromosom, sehingga bakteri mengekspresi flagelin yang berbeda dan berfungsi membantu dalam mempertahankan diri terhadap hospes (JAY dan DAVEY, 1989). Dua gen tersebut mengendalikan sintesis dua jenis flagelin yang serupa, tetapi tidak identik. Sifat tersebut diduga sebagai akibat dari duplikasi gen mikroorganisme induknya, setelah mengalami pembelahan secara random 1.000 sampai dengan 10.000 kali generasi, gen yang tadinya diam berubah menjadi aktif (JONE dan AIZAWA, 1991). Strain dari serovar *typhi* diisolasi dari Indonesia, dilaporkan bahwa biasanya serovar *typhi* umumnya bersifat monofasik, akan tetapi beberapa strain dari Indonesia mempunyai faktor H : j digantikan oleh H : d dan yang lainnya bersifat difasik H : z66. Formula flagelar berikutnya menyandi H : d : -, atau j : -, atau d : z66, atau j : z66 (GUINEE *et al.*, 1981).

### Antigen lipopolisakarida (LPS)

Polisakarida merupakan antigen pada *Salmonella* spp. paling luar yang berhubungan atau kontak langsung dengan lingkungan luar dan berinteraksi langsung dengan habitatnya. Untuk *Salmonella* spp. yang bersifat patogenik, polisakarida berguna untuk mempertahankan diri terhadap lingkungan luar atau habitatnya, seperti kekeringan, tahan terhadap asam lambung, atau asam dalam lumen usus. Komponen luar tersebut memberikan proteksi atau perlindungan bakteri. Beberapa spesies bakteri Gram negatif yang mempunyai lapisan luar polisakarida antara lain: *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. atau *Pasteurella* spp. Sedangkan *S. enterica* tidak memiliki lapisan

polisakarida dan lapisan luar selnya, berupa rantai cabang lateral dari komponen LPS (RYCROFF, 2000).

LPS merupakan komponen antigen imunogenik yang dominan dari kebanyakan dinding sel bakteri Gram-negatif yaitu berupa lipid A–Core-oligosakarida dan O-rantai samping oligosakarida. Core oligosakarida terdiri dari lapisan luar dan lapisan dalam. Koloni bakteri *Salmonella* isolat yang berasal dari alam (*wild type*) biasanya tampak halus, karena adanya rantai samping (*O-side chain*). Isolat yang sudah mengalami subkultur berulang-ulang, rantai sampingnya mengalami perubahan menjadi bentuk *irregular*, sehingga bentuk koloni tidak teratur dan tampak agak kasar (DARVEAU dan HANCOCK, 1983).

*Lipid A* dari *Salmonella* serovar *enterica* masih berada dalam membran luar, sehingga membentuk lapisan *lipid 2* lapis, berfungsi sebagai molekul endotoksin LPS (RAETZ, 1993). *Lipid A* mempunyai aktivitas biologik sebagai komponen *envelope* atau kapsul sel, dapat menimbulkan terbentuknya respon antibodi pada hewan yang sensitif (mencit). *Lipid A* dapat menginduksi efek patofisiologik, seperti: endotoksin *shock*, pyrogenisitas, *activation complement coagulase* dan perubahan hemodinamik. Pengaruh imunologik meliputi mitogenisitas sel B limfosit dan aktivasi makrofag, berpengaruh melalui induksi dan terbentuknya sitokin dari monosit dan makrofag menghasilkan interferon, faktor nekrosis tumor, faktor *colony-stimulating* dan interleukin I (QUESHI dan TAKAYAMA, 1990). Selanjutnya diduga bahwa aktivitas *lipid A* endotoksin berperan pada patogenitas atau toksisitas bakteri Gram negatif, termasuk *Salmonella*, yang pada tahap berikutnya LPS diduga mempunyai efek sebagai imunomodulator (HENDERSON *et al.*, 1996).

Sifat serologik antigen somatik akibat perubahan variabel yang dominan adalah pada rantai samping O. Rantai samping tersebut bersifat hidropobik terhadap lingkungan sel mikroba itu berada. Variasi susunan antigen tersebut merupakan ulangan-tetra dan penta-sakarida yang diselingi oleh *deoxy-* dan *dideoxy-*heksosa, banyaknya ulangan O-rantai samping bermacam-macam tergantung dari kondisi medium pertumbuhan (HITCHOCK and BROWN, 1983).

Rantai samping O-antigen dilaporkan mempunyai peranan penting terhadap interaksi bakteri *Salmonella* spp. terhadap pertahanan tubuh hospes. Perbedaan sifat virulensi dari beberapa serovar *Salmonella* telah diketahui dan dilaporkan bahwa induk serovar *S. typhimurium* (grup B) mempunyai antigen O<sub>4,12</sub> yang membawa gen penyandi sintesis antigen O<sub>-9,12</sub> dari serovar *enteritidis* (grup D) yang dibuat secara transduksi atau gen penyandi sintesis antigen O<sub>6,7</sub> dari serovar *montevideo* (grup C) yang dibuat secara transduksi menunjukkan terjadi perubahan sifat patogenisitasnya. *S. enteritidis* dari alam (*wild type*)

yang mempunyai antigen O<sub>9,12</sub> gen penyandi sintesis antigen tersebut diganti oleh gen penyandi sintesis antigen O<sub>4,12</sub> dari donor *S. typhimurium* secara transduksi menunjukkan kenaikan sifat patogenitasnya pada mencit (VOLTONEN *et al.*, 1975).

### Antigen kapsul

Antigen kapsul berupa polisakarida pada *Salmonella* spp. diidentifikasi tahun 1934 dan diberi nama Vi, nama tersebut berkaitan dengan sifat virulensinya. Biasanya hanya terdapat pada *S. typhi*, *S. paratyphi C*, *S. dublin* dan *Citrobacter freundii*. Secara serologik antigen Vi tidak bereaksi silang dengan antiserum anti-O. Namun demikian, untuk deteksi antigen somatik-O secara serologik, suspensi sel harus dipanaskan pada suhu 100°C selama 60 menit untuk menginaktifkan antigen Vi. Antigen Vi terdiri dari homopolisakarida *acid α -1,4-2 deoxy-2-N-acetyl galactosamine uronic* (RYCROFT, 2000). Antigen Vi dikelompokkan sebagai polisakarida tipe I (JANN dan

JANN, 1990). Pengelompokan itu didasarkan pada kriteria sifat khemis, fisik dan gen penyandi sintesisnya yang mempunyai bobot molekul lebih besar dan lapisan lebih tebal dibandingkan dengan polisakarida tipe II. Polisakarida tipe II mengandung *hexuronic acid* di bagian komponen asidiknya yang terekspresi sepanjang rantai LPS dari antigen-O. Gen penyandi sintesis antigen Vi terdiri dari 2 loki yaitu *viaA* dan *viaB* dalam genomik (VIRLOGEUX *et al.*, 1995).

### Antigen *fimbria* pada *Salmonella*

Klasifikasi *fimbria Salmonella* pada awalnya didasarkan pada sifat morfologi, tidak ada sifat reaksi aglutinasi eritrosit dan adanya D-manosa. Namun demikian, lama kelamaan cara klasifikasi tersebut kurang sesuai, karena secara morfologi sama dan tidak semua menunjukkan mediasi reaksi hemaglutinasi dari setiap tipe. Variasi *fimbria Salmonella* dan klasifikasinya secara singkat tertera pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Antigen *fimbria* pada *Salmonella* spp.

Nama dan tipe <i>fimbria</i>		Karakter <i>fimbria</i>				Serovar <i>Salmonella</i>	Letak gen penyandi
Tipe	Nama	Morfologi	Diameter (nm)	Bobot molekul	hema-glutinasi		
Tipe 1	F1	R	7 – 8	21 kDa	MS	<i>S. typhimurium</i>	K
	SEF21	R	7 – 8	21 kDa	MS	<i>S. enteritidis</i>	K
Tipe 2		R	7 – 8	-	NH	<i>S. pullorum</i>	
					NH	<i>S. dublin</i>	
					NH	<i>S. gallinarum</i>	
Tipe 3		F	3 – 5	22 kDa	MRTE	<i>S. enteritidis</i>	
					MRTE	<i>S. typhimurium</i>	
Tipe 4		F	3		MRFE	<i>S. typhimurium</i>	
Tipe 4 like	<i>Bundle forming</i>	F	7	18,5-21	-	<i>S. dublin</i>	
NC	SEF14	F	3	14	NH	<i>S. enteritidis</i>	K
GVVPQ	SEF17	F	3	17	NH	<i>S. enteritidis</i>	K
	<i>Thin fimbria</i>	F	3	17	NH	<i>S. typhimurium</i>	
NC	<i>Long polar fimbria</i>	R	7 – 8	-	-	<i>S. typhimurium</i>	K
NC	Plasmid yang disandi	-	-	-	-	<i>S. enteritidis</i>	P

NC: tidak terklasifikasi; R: batang; F: fibrilar; kDa: kilo Dalton; MS: *mannose sensitive*; NH: tidak ada reaksi hemaglutinasi; MRTE: *mannose resistant with tanned erythrocytes*; MRFE: *mannose resistant with fresh erythrocytes*; K: kromosom; P: plasmid; SEF: *S. enteritidis Fimbria*

**Sumber:** THORNS dan WOODWARD (2000)

*Fimbria* SEF21 tergolong ke dalam tipe 1 dari serovar *S. enteritidis* yang dapat terbentuk pada suhu inkubasi 18°C dan terbentuk secara optimal pada suhu 37°C (MULLER *et al.*, 1991), mempunyai bobot molekul 20 – 22 kilo Dalton. SEF21 bersifat manosa sensitif (dapat mengaglutinasi eritrosit) dan dapat menempel pada lektin reseptor glikoprotein dari sel epitelium (SOJKA *et al.*, 1996). Sedangkan *fimbria* tipe 2 secara morfologi serupa dengan *fimbria* tipe 1, tetapi tidak dapat mengaglutinasi eritrosit dari berbagai hewan. *Fimbria* tipe 2 ini dapat dideteksi pada *S. pullorum*, *S. gallinarum*, *S. paratyphi* B dan *S. dublin* (THORNS dan WOODWARD, 2000).

#### ***Fimbria* spesifik pada *S. enteritidis* asal unggas**

*Fimbria* SEF14 terdeteksi pada *S. enteritidis* berupa organel filamen terletak peritrik pada permukaan sel berupa rantai protein subunit yang mempunyai bobot molekul 14,3 kDa (THORNS *et al.*, 1992). SEF14 dari *S. enteritidis* bersifat spesifik, jenis *fimbria* ini hanya dimiliki oleh *S. enteritidis*. SEF14 telah dipakai dalam identifikasi untuk deteksi infeksi *S. enteritidis* dengan aglutinasi lateks pada ayam (MC LAREN *et al.*, 1992), sedangkan untuk deteksi antibodinya digunakan teknik ELISA (THORNS *et al.*, 1996).

Penyebaran infeksi *S. enteritidis* yang cepat pada industri perunggasan menyebabkan meningkatnya kasus keracunan makanan dan *foodborne disease* yang berhubungan dengan cemaran *S. enteritidis* pada produk pangan asal ternak. Untuk itu dibutuhkan teknik uji yang cepat dan tepat untuk mengidentifikasi kontaminan. Diagnosis infeksi *S. enteritidis* pada hewan dan manusia dapat dilakukan dengan metode aglutinasi menggunakan reagen lateks berdasarkan reaksi spesifik terhadap *fimbria* SEF14 (THORNS *et al.*, 1994). Hewan atau manusia yang terinfeksi atau terekspose *S. enteritidis*, di dalam darahnya dapat terbentuk antibodi spesifik terhadap antigen *fimbria* SEF14. Oleh karena itu, untuk deteksi infeksi *S. enteritidis* dapat digunakan teknik ELISA berdasarkan reaksi spesifik terhadap antigen *fimbria* SEF14. Teknik ini sangat penting dan cocok untuk deteksi reaktor spesifik dalam kelompok ayam atau flock. Dilaporkan bahwa, infeksi *S. enteritidis* pada ayam dapat dideteksi dengan adanya antibodi dalam tubuh ayam 10 hari pascainfeksi sampai 4 minggu berikutnya (THORNS *et al.*, 1996). Dalam periode tersebut, respon anti-SEF14 dari *S. enteritidis* menunjukkan titer yang tinggi.

#### **INFEKSI *Salmonella* spp. PADA UNGGAS**

Infeksi *Salmonella* spp. atau salmonelosis dilaporkan sejak tahun 1885, diisolasi pertama kali oleh

Salmon dan Smith dari kasus kholera babi dan diberi nama *Bacillus cholerasuis*. Lebih dari 2.400 serovar *Salmonella* dapat ditemukan pada hewan ternak maupun manusia. Beberapa serovar tidak mempunyai hospes yang spesifik dan penyakit yang ditimbulkan tidak khas seperti *S. typhimurium* (GRIMONT *et al.*, 2000). *Fowl typhoid* pada unggas disebabkan oleh *S. gallinarum*, merupakan penyakit unggas yang bersifat septisemik menyerang ayam dan kalkun, menyebar luas di berbagai belahan dunia dan menyebabkan kerugian ekonomi pada industri perunggasan (BARROW *et al.*, 1992). Pada pertengahan abad 19 (1950 – 1960) adanya kasus salmonelosis akibat infeksi *S. typhi* dilaporkan menyebabkan demam tifus pada manusia (MANDAL, 1979). Serovar *S. typhi* dan *S. typhimurium* banyak diisolasi dari unggas dan produknya, yang disinyalir sebagai perantara penyebaran salmonelosis pada manusia (BEAN dan GRIFFIN, 1990).

*S. enteritidis* yang diisolasi di laboratorium dari sampel unggas dalam 20 tahun terakhir prevalensinya cenderung mengalami kenaikan, dibandingkan dengan *S. typhimurium* (SAEED dan KOONS, 1993). Seperti telah dilaporkan di Inggris bahwa prevalensi *S. enteritidis* tahun 1985 sebesar 35%, naik sebanyak 6,9% menjadi 41,9% pada tahun 1986, terus naik menjadi 47,8% tahun 1988 dan 48,3% tahun 1989. Prevalensi yang paling mendominasi adalah serovar *S. enteritidis phage* tipe 4 yaitu sebesar 71% (MC LLROY *et al.*, 1989).

#### **Infeksi *S. enteritidis* di Indonesia**

Serovar *S. enteritidis* merupakan bakteri patogen penting pada unggas dan dapat menyebabkan paratifus pada manusia. Fenomena keracunan makanan berkaitan erat dengan meningkatnya jumlah populasi ayam atau jumlah telur ayam yang terkontaminasi oleh bakteri *S. enteritidis* (HUMPHREY, 1990). Dari kajian retrospektif salmonelosis yang berkaitan dengan pemeriksaan sampel hewan ternak unggas dan produk ternak periode tahun 1985 – 1990 jumlah isolat serovar *S. typhimurium* mendominasi dengan prevalensi 26,6% (89/349), dan dari 18 macam serovar lainnya belum terdeteksi adanya *S. enteritidis*. Sedangkan pada periode tahun 1991 – 2003 isolat serovar *S. enteritidis* menunjukkan persentase 47% (297/625) dari 27 macam serovar *Salmonella* (SUPAR dan ARIYANTI, 2005), menggeser kasus *S. typhimurium* yang hanya 27 isolat. Sedangkan berdasarkan *phage serotyping* dari 57 isolat, prevalensi *S. enteritidis phage* tipe 4 sebesar 89,5% (POERNOMO *et al.*, 2006).

Walaupun morbiditas dan mortalitas salmonelosis pada unggas rendah, tetapi dapat menimbulkan masalah terhadap kesehatan unggas dan berdampak pada kerugian ekonomi pada industri perunggasan. Disamping itu, unggas penderita salmonelosis dapat

menularkan bakteri secara horizontal, secara vertikal melalui telur, mencemari lingkungan peternakan dan mencemari produk daging (HUMPHREY, 1990), bahkan telur ayam ras untuk konsumsi yang dijual di berbagai pasar di daerah Bogor dapat dideteksi adanya *S. enteritidis* (KUSUMANINGSIH, 2007).

Ayam semua umur dapat terinfeksi *S. enteritidis*, namun yang paling rentan pada periode DOC umur 1 – 4 hari dan disertai dengan gejala klinis. Sedangkan infeksi pada anak ayam umur 2 minggu tidak menimbulkan gejala klinis. Ayam yang sembuh dari infeksi dapat menjadi karier kronik (menahun) dan sewaktu-waktu dapat mengekskresikan bakteri dalam fesesnya. Rute infeksi pada anak ayam yang paling rentan melalui inhalasi, dan selanjutnya dapat menginvasi ke dalam saluran darah. Dilaporkan juga bahwa *S. enteritidis phage* tipe 4 lebih bersifat invasif terhadap anak ayam atau ayam muda (HINTON *et al.*, 1990). Kebanyakan serovar *S. enteritidis* yang diisolasi di Indonesia tergolong dalam *phage* tipe 4, oleh sebab itu perlu dilakukan penelitian pengembangan vaksin *S. enteritidis* untuk ayam petelur dan *breeder* guna meningkatkan maternal antibodi dalam tubuh DOC dan atau untuk meningkatkan antibodi dalam kuning telur.

### IMUNITAS *Salmonella* spp. PADA UNGGAS

*Salmonella* spp. merupakan salah satu mikroba yang mengancam industri perunggasan. Serovar tertentu sangat patogenik dan menyerang unggas dengan morbiditas dan mortalitas tinggi terutama *day old chickens* (DOC). Disamping itu, juga menyebabkan penyakit pada manusia yang secara substansial berhubungan dengan konsumsi produk peternakan yang terinfeksi atau tercemar *Salmonella* spp. (HUMPHREY, 1990).

Sistem kekebalan pada hewan (unggas) terdiri dari: *innate immunity* (kekebalan nonspesifik) dan kekebalan spesifik. Kekebalan non spesifik berupa komplemen dan sel pertahanan tubuh, antara lain: sel *polymorphonuclear neutrophils* (pada ayam disebut heterophils), sel makrofag dan sel *killer* (KOGUT *et al.*, 1994). Komponen pertahanan tubuh tersebut berfungsi sebagai pelindung terhadap serangan patogen. Sedangkan, sistem kekebalan spesifik terdiri dari dua kelompok utama, yaitu kekebalan humoral dan *Cell Mediated Immunity* (CMI) (MASTROENI *et al.*, 1993; SCHAT, 1994).

Imunitas humoral pada hewan yang terinfeksi *Salmonella* sp. umumnya dapat terjadi. Terbentuknya imunitas tersebut dipengaruhi oleh banyak faktor, antara lain: dosis atau jumlah antigen, sifat virulensi, rute infeksi dan umur hewan. Faktor umur hewan sangat nyata pengaruhnya terhadap pembentukan antibodi. Respon antibodi pada hewan muda mungkin hanya terbatas pada epitop antigen tertentu, hewan

muda respon imunologiknya paling rendah (THORNS *et al.*, 1996). Pemberian antigen *S. typhimurium* pada anak ayam umur 1 – 2 minggu hanya menimbulkan respon antibodi yang lemah. Kondisi ini mungkin disebabkan oleh sifat hiporesponsif sel-sel pada sistem imunitas yang belum berfungsi secara mature (JEURISSEN *et al.*, 1989), atau diseminasi jaringan limfoid masih sangat muda dan fungsi pembentukan antibodi belum sempurna, sehingga antibodi yang terbentuk pada anak ayam rendah (CORKISH *et al.*, 1994).

### Diagnosis serologik infeksi *Salmonella* spp. pada unggas

Infeksi bakteri *Salmonella* spp. pada unggas dan masalah yang diakibatkan pada produksi peternakan serta hubungannya dengan cemaran pada produk pangan asal ternak menimbulkan dampak negatif berupa *food poisoning* dan *foodborne disease*. Masalah tersebut menjadi perhatian semua pihak baik para pemegang kebijakan hewan dan kesehatan masyarakat veteriner. Atas dasar tersebut, perlu dilakukan pemeriksaan penyakit salmonellosis pada ternak di tingkat produsen atau lapangan maupun produk hasil olahannya. Infeksi *Salmonella* pada hewan ternak sifatnya subklinikal, tidak ada gejala klinis yang terlihat, kecuali pada anak ayam atau hewan muda. Konfirmasi diagnosis salmonellosis pada awalnya dilakukan dengan kultur berdasarkan pada isolasi dan identifikasi bakteri yang disekresi melalui feses, akan tetapi sekresi melalui feses bersifat *intermittent*. Pengambilan sampel feses yang tidak tepat menyebabkan hasil diagnosis yang salah. Diagnosis dengan pemeriksaan serologik mempunyai keunggulan dibandingkan dengan cara kultur tersebut, karena antibodi ayam atau hewan yang terinfeksi *Salmonella* secara persisten berada dalam sirkulasi darah (NIELSON *et al.*, 1995). Namun demikian diagnosis serologik juga ada sedikit kelemahannya, terutama pada serovar *Salmonella* yang bersifat non invasif, sebagai contoh *S. invantis*. Hewan yang terinfeksi mensekresi bakteri dalam feses, tidak terbentuk respon antibodi atau IgG. Dengan demikian, diagnosis salmonellosis dengan serologik hanya cocok untuk infeksi *Salmonella* yang bersifat invasif, sebagai contoh yaitu: *S. dublin* menginvasi sapi, *S. choleraesuis* menginvasi babi, *S. enteritidis*, *S. pullorum*, *S. gallinarum* menginvasi unggas dan *S. typhimurium* menginvasi semua hewan dan manusia (BARROW *et al.*, 1994).

Diagnosis serologik salmonellosis pada unggas yang disebabkan oleh infeksi *S. pullorum*, *S. gallinarum* dapat dilakukan baik dengan teknik aglutinasi serum dan atau uji aglutinasi *whole blood*. Cara tersebut dapat mengeliminasi semua reaktor positif dalam upaya pemberantasan pulorum dan fowl

*typhoid* pada unggas sejak beberapa tahun yang lalu (BARROW *et al.*, 1992). Akan tetapi cara aglutinasi tersebut tidak dapat membedakan secara spesifik infeksi yang disebabkan oleh infeksi *S. pullorum*, *S. gallinarum* atau *S. enteritidis* (CHART *et al.*, 1990), karena ketiga serovar tersebut tergolong dalam satu grup D dan mempunyai sifat reaksi silang antigen somatik O<sub>-1,9,12</sub> (antigen LPS).

Uji aglutinasi *whole blood* dengan antigen pulorum polivalen telah dipakai untuk mengeliminasi reaktor positif pada peternakan *breeder* di Indonesia sejak tahun 1978 (POERNOMO, 1978; 2004).

### **Pengembangan ELISA untuk diagnosis infeksi *S. enteritidis* pada unggas**

Diagnosis serologik salmonellosis secara ELISA menggunakan antigen LPS untuk deteksi infeksi *S. enteritidis*, *S. pullorum*, *S. gallinarum* dan *S. typhimurium* pada ayam menunjukkan hasil titer antibodi (IgG) lebih tinggi dengan menggunakan antigen homolog dibandingkan dengan antigen LPS heterolog, tetapi hasilnya memberikan reaksi silang antara serotipe tersebut (BARROW *et al.*, 1992). Fenomena ini dapat dijelaskan bahwa *S. enteritidis* termasuk dalam grup D, mempunyai antigen somatik O<sub>-1,9,12</sub> (LPS); demikian juga dengan *S. pullorum* dan *S. gallinarum* yang termasuk dalam grup D juga mempunyai antigen somatik O<sub>-1,9,12</sub> (LPS); sedang *S. typhimurium* yang termasuk grup B mempunyai antigen somatik O<sub>-1,4,5,12</sub> (LPS) (EWINGS, 1986). Dengan demikian, diagnosis salmonellosis pada unggas secara ELISA menggunakan antigen LPS tidak dapat membedakan antibodi spesifik akibat infeksi dari masing-masing serovar tersebut.

Dalam upaya menghilangkan pengaruh reaksi silang antara infeksi serovar *Salmonella* tersebut diatas maka untuk diagnosis serologik dengan ELISA, dipakai antigen flagela. Pada ayam percobaan yang diinfeksi *S. typhimurium* dapat terbentuk antibodi spesifik terhadap flagela. Aplikasi deteksi anti-flagela i<sub>-1,2</sub> antibodi pada sampel lapangan menemui kesulitan karena adanya reaksi silang (seperti pada ELISA LPS) diantara serovar *Salmonella*. Dilaporkan pula bahwa spesifik flagela IgG (i<sub>-1,2</sub>) antibodi tidak konsisten dalam tubuh ayam, titer antibodi menurun dan menghilang sesudah 4 bulan setelah vaksinasi, namun titik puncak titer tertinggi flagela IgG lebih awal daripada titer LPS-IgG (HASSAN *et al.*, 1990).

Deteksi flagela IgG dengan ELISA pada ayam yang diinfeksi *S. enteritidis* menunjukkan bahwa ayam yang diinfeksi dengan bakteri tersebut menimbulkan respon antibodi terhadap flagela (gm) (TIMONEY *et al.*, 1990). ELISA menggunakan antigen flagela gm dapat membedakan ayam yang terinfeksi baik oleh *S. pullorum* atau *S. gallinarum*, dan temuan ini didukung

dengan pemeriksaan *immunoblotting* (BARROW *et al.*, 1992). Hal serupa dilaporkan bahwa dengan antigen flagela gm dapat membedakan ayam yang terinfeksi *S. enteritidis* dan *S. pullorum* (ARIYANTI dan SUPAR, 2007). Namun demikian, serovar *Salmonella* lain yang mempunyai antigen g atau m dapat menunjukkan reaksi silang (EWINGS, 1986).

Dalam dua dasawarsa terakhir temuan isolat *S. enteritidis* berdasarkan pemeriksaan laboratorium terus meningkat. Hal ini menunjukkan peningkatan penularan atau penyebaran infeksi *S. enteritidis* (POERNOMO, 2004). Diagnosis serologik spesifik terhadap infeksi *S. enteritidis* secara dini masih cocok namun untuk kondisi laboratorium veteriner regional masih jauh dari harapan. Telah disebutkan sebelumnya bahwa *S. enteritidis* mempunyai antigen *fimbria* spesifik SEF14. Antibodi dalam tubuh ayam dapat dideteksi secara ELISA, akan tetapi ELISA kit tersebut tidak ada di pasaran (THORNS *et al.*, 1996). Teknik ELISA dengan antigen *fimbria* SEF14 perlu dikaji lebih lanjut untuk aplikasinya dalam diagnosis serologik *S. enteritidis* dan serovar lain penyebab paratifus pada unggas, hewan lain dan manusia.

### **Pengembangan vaksin *S. enteritidis***

Infeksi *S. enteritidis* pada unggas di beberapa negara menjadi isu penting dalam kaitannya dengan imunitas atau daya kekebalan pada unggas, baik kekebalan aktif maupun kekebalan nonspesifik. Salmonellosis baik dalam bentuk klinis, kronis maupun subklinis, menyebabkan kerugian ekonomi di industri peternakan, baik dari aspek keselamatan hewan, kesejahteraan maupun kesehatan masyarakat (HELMUTH, 2000).

Masalah keracunan makanan yang disebabkan oleh *S. enteritidis phage* tipe 4 pada manusia akibat mengkonsumsi makanan yang tercemar bakteri tersebut, dan akibat makin meluasnya penyebaran infeksi *S. enteritidis* pada ayam petelur atau kontaminasi pada telur dan produk-produknya, perlu dilakukan upaya pengendalian salmonellosis pada unggas (GAST *et al.*, 1992). Pengendalian salmonellosis pada industri perunggasan dengan menggunakan berbagai sediaan antibiotika yang telah dilakukan selama puluhan tahun mengakibatkan terjadinya multipel resistensi dan residu antibiotika pada daging dan telur ayam (HELMUTH, 2000). Oleh karena itu, perlu diupayakan pengendalian alternatif yaitu dengan menggunakan vaksin yang efektif. Sejak dua dasawarsa terakhir di beberapa negara seperti Belanda dan Amerika telah mulai melakukan penelitian dan pengembangan vaksin inaktif salmonellosis yang diemulsikan dalam *alhydrogel*, emulsi minyak atau disiapkan dalam *microsphere* (sejenis kapsul). Vaksin tersebut dilaporkan dapat menimbulkan respon

kekebalan pada unggas dan memberikan proteksi terhadap infeksi *S. enteritidis* di peternakan dan penyebaran infeksi *S. enteritidis* di lingkungan peternakan dan sekitarnya (FEBERWEE *et al.*, 2001; SMITH, 2006).

Awal pengembangan vaksin salmonellosis untuk unggas ialah *S. gallinarum-pullorum* strain 9R bersifat koloni kasar dari hasil atenuasi sehingga tidak patogen. Vaksin hidup yang diaplikasikan secara per oral dapat memberikan proteksi terhadap reinfeksi. Selanjutnya vaksin sejenis dibuat dari *S. gallinarum* strain 9S dari galur koloni halus bersifat lebih virulen, namun penggunaan vaksin aktif strain 9S dilaporkan tidak efektif (SILVA *et al.*, 1981). Hasil penelitian FEBERWEE *et al.* (2001) mengemukakan bahwa vaksin aktif *S. gallinarum* 9R dari galur koloni kasar hasil atenuasi digunakan untuk pengendalian infeksi *S. enteritidis* di 80 flock dan untuk kontrol 1.854 flock di bawah kondisi lapangan. Aplikasi vaksin pada peternakan komersial di negeri Belanda di bawah kondisi lapangan masih ditemukan bakteri sebanyak 2/80 flock (2,5%) dan pada kelompok kontrol 214/1854 flock (11,5%). Tiga ratus sampel telur dari kelompok vaksinasi, 1% positif *S. gallinarum*. Walaupun temuan reisolasi bakteri dari vaksin relatif kecil dan masih terdeteksi dalam periode produksi telur, aplikasi vaksin hidup *S. gallinarum* belum memberikan hasil yang aman. Hal ini ditunjukkan dengan adanya *shedding* bakteri dalam tubuh ayam selama hidupnya dan disekresikan melalui telur.

TIMMS *et al.* (1990) melaporkan bahwa penggunaan vaksin *S. enteritidis phage* tipe 4 (SEPT 4) yang mengandung  $10^{11}$  CFU/ml bakteri dalam adjuvan dapat diaplikasikan dengan dosis tunggal pada ayam umur 3 minggu atau 2x dosis pada ayam umur 3 dan 6 minggu, vaksin tersebut mampu melindungi terhadap ujiantang isolat virulen *S. enteritidis* ( $10^8 - 10^9$  CFU) yang diberikan 2 minggu setelah vaksinasi secara intramuskular atau intravena. Aplikasi 2 x dosis vaksin menunjukkan Index Proteksi (IP : 100%) lebih tinggi dibandingkan dengan penggunaan vaksin dosis tunggal (IP : 56%) terhadap ujiantang secara intravena pada ayam umur 8 minggu. Reisolasi bakteri tantang juga tidak ditemukan pada hati, jantung, limpa, kandung kemih, ovarium dan sekum pada kelompok vaksinasi dengan 2 x dosis.

Vaksin bakterin *S. enteritidis* dalam emulsi minyak yang diaplikasikan 2 x dosis dan 2 minggu setelah *booster* ditantang dengan  $10^8$  *S. enteritidis*, efikasinya terlihat dengan berkurangnya kolonisasi bakteri tantang dalam usus. Perbedaan terlihat signifikan antara kelompok yang divaksin dibandingkan dengan kelompok kontrol, dan bakteri yang disekresikan dalam feses, rata-rata terjadi setelah 1 minggu ujiantang. Namun demikian, tingkat proteksi pada kelompok vaksinasi terlihat belum

optimal karena sekresi bakteri masih ditemukan pada kelompok vaksinasi 1 – 2 hari setelah ujiantang (GAST *et al.*, 1993). Pengurangan tingkat infeksi *S. enteritidis* juga terlihat pada efikasi vaksin *S. enteritidis* dalam emulsi minyak yang dilakukan oleh MIYAMOTO *et al.* (1999). Pada kelompok vaksinasi masih menunjukkan adanya bakteri tantang sebesar 19% (36 dari 189 telur) dan pada kelompok non vaksinasi sebesar 37% (61 dari 165 telur). Jumlah bakteri pada limpa, ovarium dan swab kloakal-vagina, pada kelompok vaksinasi lebih rendah dari kelompok kontrol pada hari ke-7 setelah tantang. Respon antibodi yang dideteksi dengan ELISA pada kelompok vaksinasi lebih tinggi dari kelompok kontrol (berbeda nyata pada dosis tunggal dan berbeda sangat nyata pada 2 x dosis).

Pengendalian salmonellosis sangat penting hubungannya dengan infeksi *S. enteritidis* pada industri perunggasan. Oleh karena itu, pengendalian dengan cara meningkatkan kekebalan unggas dengan vaksinasi yang efektif untuk melawan infeksi lebih layak dibandingkan dengan penggunaan antibiotika. Tinjauan kembali dari beberapa penelitian pengembangan vaksin *Salmonella* mengindikasikan bahwa anak ayam petelur umur 3 – 6 minggu yang divaksinasi dengan vaksin inaktif *S. enteritidis* secara subkutan dapat memberikan proteksi terhadap ujiantang. Aplikasi vaksin inaktif tidak berpengaruh negatif terhadap pertambahan bobot hidup ayam yang sedang tumbuh. Antibodi dalam darah ayam tetap tinggi 5 – 6 minggu setelah vaksinasi (TIMMS *et al.*, 1990).

Sejalan dengan karakterisasi dan pengembangan diagnosis infeksi *S. enteritidis*, telah dilakukan juga pembuatan antigen inaktif *S. enteritidis* isolat Indonesia untuk pengembangan vaksin. Dalam uji potensi di bawah kondisi laboratorium menunjukkan bahwa 2 dosis vaksin inaktif yang diinjeksikan pada anak ayam petelur dara umur 14 minggu dan diulang 4 minggu berikutnya kemudian ditantang dengan *S. enteritidis* yang homolog secara oral pada 2 minggu setelah ulangan, mampu memberikan daya proteksi terhadap bakteri tantang yang homolog. Pada ayam kontrol, bakteri tantang tersebut dapat direisolasi dari feses, hati, sekum, ovarium dan telur. Sebaliknya, pada kelompok vaksinasi tidak ditemukan adanya bakteri penantang dalam feses, hati, sekum, ovarium dan telur (ARIYANTI dan SUPAR, 2006). Aplikasi vaksin tersebut pada kondisi lapang masih perlu penelitian lebih lanjut.

## KESIMPULAN

Bakteri yang termasuk dalam genus *Salmonella* terdiri dari banyak serovar yang tersebar luas, merupakan patogen enterik yang dapat menginfeksi dan menyebabkan penyakit salmonellosis pada semua jenis hewan dan manusia (zoonotik). Penularan dapat



terjadi secara vertikal melalui telur, dan secara horizontal lewat feses dan cemaran lingkungan. Konfirmasi diagnosis penyakit salmonellosis didasarkan pada isolasi bakteri sampai genus dilanjutkan dengan *serotyping*, tetapi kurang sensitif. Diagnosis yang lebih sensitif adalah dengan serologik yaitu deteksi antibodi (IgG) terhadap antigen somatik dan flagela. Antigen *Salmonella* spp. bermacam-macam, terdiri dari antigen somatik (O), flagela (H) dan antigen kapsul (Vi).

Serovar spesifik beradaptasi pada hospes spesifik unggas (*S. pullorum*, *S. gallinarum*), pengendaliannya dilakukan dengan *test and slaughter*. Serovar *S. enteritidis* dan *S. typhimurium* dapat menginfeksi semua jenis hewan terutama ayam dan manusia. Penyebaran infeksi *S. enteritidis* di dunia sangat cepat dalam 2 dekade terakhir, dapat menyebabkan kerugian ekonomi berupa biaya produksi dan pengobatan di peternakan menjadi lebih tinggi, timbulnya resistensi terhadap antibiotika, timbulnya residu antibiotika pada daging maupun telur ayam. Selain itu dapat menimbulkan bahaya terhadap kesehatan manusia karena *S. enteritidis* dapat mencemari makanan sehingga menyebabkan timbulnya *foodborne disease*. Pengembangan vaksin *S. enteritidis* isolat lokal telah diuji potensinya cukup baik, tetapi efikasi di lapangan masih perlu penelitian lebih lanjut.

#### DAFTAR PUSTAKA

- ARIYANTI, T. dan SUPAR. 2006. Proteksi antigen sel utuh inaktif dari *S. enteritidis phage* tipe 4 terhadap uji tantang galur homolog pada ayam percobaan. *Widya Riset* 9(3): 189-196.
- ARIYANTI, T. dan SUPAR. 2007. Deteksi antibodi terhadap *Salmonella enteritidis* dan *Salmonella pullorum* pada ayam dengan ELISA menggunakan antigen somatik dan flagela. *J. Kedokteran Hewan Indonesia* 8(3): 111 – 118.
- BARROW, P.A., A. BERCHIERI and O. AL-HADDAD. 1992. The serological response of chicken to infection with *Salmonella gallinarum-pullorum* detected by ELISA. *Avian Dis.* 36: 227 – 236.
- BARROW, P.A., J.O. HASSAN, A.P.A. MOCKETT and MC LEOD. 1994. Host specificity of *Salmonella* infection in chickens and mice is expressed *in vivo* primarily at the reticulo endothelial system. *Infect. Immun.* 62: 4602 – 4610.
- BEAN, N.H. and P.M. GRIFFIN. 1990. Foodborne disease outbreaks in the United State, 1973 – 1987, pathogens, vehicle, and trends. *J. Food Protection.* 53: 804 – 817.
- CHART, H., B. ROWE, A. BASKERVILLE and T.J. HUMPHREY. 1990. Serological test for *Salmonella enteritidis* in chickens. *Vet. Rec.* 126: 20 – 21.
- CORKISH, J.D., R.H. DAVIES, C. WRAY and R.A. NICHOLAS. 1994. Observation on broiler breeder flock naturally infected with *Salmonella enteritidis phage* type 4. *Vet. Rec.* 134: 591 – 594.
- DARVEAU, R.P. and R.E.W. HANCOCK. 1983. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 155: 831 – 838.
- EWINGS, W.H. 1986. The genus *Salmonella*. In: Identification of Enterobacteriaceae. Fourth Edition. Elsevier, New York. pp: 146 – 207
- FEBERWEE, A., T.S. DE VRIES, E.G. HARIMAN, J.J. DE WIT, A.R.W.ELBERS and W.A. DE JONG. 2001. Vaccination against *Salmonella enteritidis* in Dutch commercial layer flocks with a vaccine based on a live *Salmonella gallinarum* 9 R strain: Evaluation of efficacy, safety and performance of serologic test. *Avian Dis.* 45: 83 – 91.
- GAST, R.K., H.D. STONE and P.S. HOLT. 1993. Evaluation of the efficacy of oil-emulsion bacterins for reducing fecal shedding of *Salmonella enteritidis* by laying hens. *Avian Dis.* 37: 1085 – 1091.
- GAST, R.K., H.D. STONE, P.S. HOLT and C.W. BEARD. 1992. Evaluation of the efficacy of an oil-emulsion bacterin for protecting chickens against *Salmonella enteritidis*. *Avian Dis.* 36: 992 – 999.
- GRIMONT, P.A.D., F. GRIMONT and P. BOUVET, 2000. Taxonomy of the genus *Salmonella*. In: *Salmonella* in Domestic Animals. WRAY, C. and A. WRAY (Eds.) CABI Publishing, CAB International Wallingford UK. pp. 1 – 17.
- GUINEE, P.A.M., W.H. JANSEN, H.M.E. MAAS, L. LE MINOR and R. BEAUD. 1981. Unusual H antigen (z66) in strains of *Salmonella typhi*. *Annal. de Microbiologie* 132: 331 – 334.
- HASSAN, J.O., P.A. BARROW, A.P.A. MOCCKETT and MC LEOD. 1990. Antibody response to experimental *Salmonella typhimurium* infection in chicken measured by ELISA. *Vet. Rec.* 126: 519 – 522.
- HELMUTH, R. 2000. Antibiotic resistance in *Salmonella*. In: *Salmonella* in Domestic Animals. WRAY, C. and A. WRAY (Eds.). CABI Publishing, CAB International, Wallingford, UK 3555. pp. 89 – 106.
- HENDERSON, B., S. POOLE and M. WILSON. 1996. Bacterial modulin: A novel class of virulence factor which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol. Rev.* 60: 316 – 341.
- HINTON, M., E.J. THRESFALL and B. ROWE. 1990. The invasiveness of different strain of *Salmonella enteritidis phage* type 4 for young chicken. *FEMS Microbiol. Letters* 70: 193 – 196.
- HITCHOCK, P.J. and T.M. BROWN. 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharides chemotypes in silver-stained polyacrylamide gel. *J. Bacteriol.* 154: 269 – 277.

- HUMPHREY, T.J. 1990. Public health implication of the infection of egg-layings with *Salmonella enteritidis* phage type 4. *World Poult. Sci. J.* 46: 5 – 13.
- JANN, B. and K. JANN. 1990. Structure and biosynthesis of the capsular antigens of *Escherichia coli*. *Current Topic. Microbiol. Immun.* 150: 19 – 42.
- JAY, L.S. and G.R. DAVEY. 1989. *Salmonella* characteristics, identification and enumeration. *In: Foodborne microorganisms of public health significance. Fourth Edition.* BUCKLE, K.A., J.A. DAVEY, M.J. EYLES, A.D. HOCKING, K.G. NEWTON and E.J. STUATTARD (Eds.). Australian Institute of Food Science and Technology Ltd. pp. 53 – 82.
- JEURISSEN, S.H.M., E.M. JANSE, G. KOCH and G.F. DEBOER. 1989. Post natal development of mucosa-associated lymphoid tissue in chickens. *Cell Tissue Res.* 258: 119 – 124.
- JIANG, X.M., B. NEA, B. SANTIAGO, S.J. LEE, L.K. ROMANA and P.R. REEVES. 1991. Structure and sequence of the *rfb* (O antigen) gene cluster of *Salmonella* serovar *typhimurium* (strain LT<sub>2</sub>). *Molecul. Microbiol.* 5: 695 – 713.
- JONE, X.M. and S.I. AIZAWA. 1991. The bacterial flagellum and flagellar motor: Structure, assembly and function. *Adv. Microbiol. Physiol.* 32: 110 – 172.
- KIM, C.J., K.V. NAGARAJA and B.S. POMEROY. 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Salmonella enteritidis* infection in chicken. *Am. J. Vet. Res.* 52: 1069 – 1074.
- KOGUT, M.H., G.I. TELLEZ, E.D. MC GRUDER, B.M. HARGIS, W.D. WILLIAMS D.E. CORRIER and J.R. DELOACH. 1994. Heterophils are decisive component in the early responses of chickens to *Salmonella enteritidis* infection. *Microbiol. Pathogenesis* 16: 141 – 151.
- KUSUMANINGSIH, A. 2007. Profil dan gen resistensi antimikroba *Salmonella enterica* serotipe Enteritidis asal ayam, telur dan manusia. Disertasi Doktor. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor. 113 hlm.
- MANDAL, B.K. 1979. Typhoid and paratyphoid fever. *Clinic Gastroenterolog* 8: 715 – 735.
- MASTROENI, P., B.V. RAMOS and C.E. HORMAECHE. 1993. Adaptive transfer of immunity to oral challenge with virulent *Salmonella* in innately susceptible BALB/c mice requires both serum and T cells. *Infect. Immun.* 61: 3981 – 3984.
- MC DONOUGH, P.L., R.H. JACOBSON, J.F. TIMONEY, A. MUTALIB, D.C. KRADEL, Y. CHANG, D.H. LEIN and K. WHEELER. 1998. Interpretation of antibody response to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis gm flagella in poultry flock are enhanced by a kinetic – based enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinic. Diagn. Laborat. Immunol.* 5(4): 550 – 565.
- MC LAREN, L.M., M.G. SOJKA, C.J. THORNS and C. WRAY. 1992. An interlaboratory trial of latex agglutination kit for rapid agglutination of *Salmonella enteritidis*. *Vet. Rec.* 131: 235 – 236.
- MC LLROY, S.G., R.M. MC CRACKEN, S.D. NEILL and J.J. O'BRIEN. 1989. Control, prevention and eradication of *Salmonella enteritidis* infection in broiler and broiler breeder flocks. *Vet. Rec.* 125: 545 – 548.
- MIYAMOTO, T., D. KITAKOTA, G.S.K. WITHANAGE, T. FUKATA, K. SASAI and E. BABA. 1999. Evaluation of the efficacy of *Salmonella enteritidis* oil-emulsion bacterin an intravaginal challenge model in hens. *Avian Dis.* 43: 497 – 505.
- MULLER, K.H., K.S. KOLLINSON, T.J. TRUST and W.W. KAY. 1991. Type I *fimbriae* of *Salmonella enteritidis*. *J. Bacteriol.* 173: 4765 – 4772.
- NIELSON, B., D. BAYGEAU, F. BAGER, J. HAUGEGAARD and P. LIND. 1995. The serological response to *Salmonella* serovar *typhimurium* and *infantis* in experimentally infected pigs, the time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examined. *Vet. Microbiol.* 47: 205 – 218.
- OLIVEIRA, G., H. DE, A. BERCHIERI JUNIOR, H.J. MONTASIEE and A.C. FERNANDES. 2004. Assesment of serological response of chickens to *Salmonella gallinarum* and *Salmonella pullorum*, *Brazilian J. Poult. Sci.* 6(2): 111 – 115.
- POERNOMO, S. 1978. Penyakit pullorum di Indonesia: Uji aglutinasi cepat serum pada ayam kampung. *Bull. LPPH X(16):* 32 – 34.
- POERNOMO, S. 2000. Training Microbiological Diagnostic. *Balitvet Newsletter* 15(1): 5 – 7.
- POERNOMO, S. 2004. Variasi tipe antigen *Salmonella pullorum* yang ditemukan di Indonesia dan penyebaran serotipe *Salmonella* pada ternak (PO). *Wartazoa* 14(4): 143 – 159.
- POERNOMO, S. dan S. HARDJOUTOMO. 1977. Penyakit pullorum di Indonesia: pemakaian antigen berwarna polivalen pullorum. *Bull. LPPH IX(14):* 22 – 35.
- POERNOMO, S. dan S. HARDJOUTOMO. 1981. Penelitian pendahuluan distribusi *Salmonella* spp. pada hewan. *Bull. Balai Penelitian Penyakit Hewan* 22: 16 – 28.
- POERNOMO, S., A. PRIADI dan L. NATALIA. 2006. *Phage typing* dan uji sensitivitas terhadap berbagai antibiotika dari isolat *Salmonella enteritidis* asal Indonesia. *JITV* 11(2): 157 – 166.
- POPOFF, M., J. BOCKEMUHL and F.W. BRENNER. 1998. Supplement to the Kauffmann-white scheme. *Res. Int. Microbiol.* 149: 601 – 604.
- QUESHI, N. and K. TAKAYAMA. 1990. Structure and function of lipid A. *In: The Bacteria. Vol. XI. Molecular basis of bacterial pathogenesis.* INGLEWSKI, B.H. and V.L. CLARK (Eds.). Academic Press. London. pp. 319 – 338.

- RAEYZT, C.R.M. 1993. Bacterial endotoxins: Extraordinary lipid that activate eukaryotic signal transduction. *J. Bacteriol.* 175: 5745 – 5753.
- RUBIN, E.A., D.J. KOPECKO, K.F. NOON and L.S. BARON. 1985. Development of a DNA probe to detect *Salmonella typhi*. *J. Clin. Microbiol.* 22: 600 – 605.
- RYCROFF, A.N. 2000. Structure, function and synthesis of surface polisaccharides in *Salmonella*. In: *Salmonella in Domestic Animals*. WRAY, C. and A. WRAY (Eds.) CABI Publishing, CAB International Wallingford UK. pp: 19 – 33.
- SAEED, A.M. and C. KOONS. 1993. Growth and heat resistance of *Salmonella enteritidis* in refrigerated and abused eggs. *J. Food Hygiene.* 56: 927 – 931.
- SCHAT, K.A. 1994. Cell-mediated immune effector functions in chickens. *Poult. Sci.* 73: 1077 – 1081.
- SILVA, E.N., G.H. SNOYENBOS, O.M. WEINACK and C.F. SMYER. 1981. Studies on the use of 9R strain of *Salmonella gallinarum* as a vaccine in chickens. *Avian Dis.* 25: 38 – 52.
- SMITH, T. 2006. Food safety vaccine. Food Safety Research Office (FSIRO), United States Departement of Agriculture – Agricultural Research Service. <http://fsiro.nal.usda.gov>. (June, 26<sup>th</sup> 2006).
- SOJKA, M.G., M. DIFF-FULLER and C.J. THORNS. 1996. Characterization of monoclonal antibody specific to SEF21 *fimbriae* of *Salmonella enteritidis* and their reactivity with other *Salmonella* and enterobacteria. *Vet. Microbiol.* 48: 207 – 221.
- SUPAR dan T. ARIYANTI. 2005. Keamanan pangan produk peternakan ditinjau dari aspek penyakit. *Wartazoa* 15(4): 187 – 205.
- THORNS, C.J. and M.J. WOODWARD. 2000. Fimbria of *Salmonella*. In: *Salmonella in Domestic Animals*. WRAY, C. and A. WRAY (Eds.) CABI Publishing, CAB International, Wallingford, UK. 3555. pp: 35 – 55.
- THORNS, C.J., I.M. MC LAREN and M.G. SOJKA 1994. The use of latex agglutination to specifically detect *Salmonella enteritidis*. *Int. J. Food Microbiol.* 21: 47 – 49.
- THORNS, C.J., M.G. SOJKA, I.M. MC LAREN and M. DIFF-FULLER. 1992. Characterization of monoclonal antibodies against a fimbrial structure *Salmonella enteritidis* and certain other serogroup D *Salmonella* and their application as serotyping reagens. *Rec. Vet. Sci.* 53: 300 – 308.
- THORNS, C.J., M.M. BELL, M.G. SOJKA and R.A. NICHOLAS. 1996. Development and application of enzyme-linked immunsorbent assay for specific detection of *Salmonella enteritidis* infection in chickens based on antibody to SEF14 *fimbrial* antigen. *J. Clin. Mikrobiol.* 34: 792 – 797.
- TIMMS, L.M., R.N. MARSHALL and M.F. BRESLIN. 1990. Laboratory assessment of protection given by an experimental *Salmonella enteritidis* PT4 inactivated adjuvant vaccine. *Vet. Rec.* 127: 611 – 614.
- TIMONEY, J.F., H.L. SHIVAPRASAD and M. OPTIS. 1990. Detection of antibody to *Salmonella enteritidis* by a gm flagellin-based ELISA. *Vet. Rec.* 127: 168 – 169.
- TIMONEY, J.F., H.L. SHIVAPRASAD, R.C. BAKER and B. ROWE. 1989. Egg transmission after infection of hen with *Salmonella enteritidis* phage type 4. *Vet. Rec.* 125: 600 – 601.
- VIRLOGEUX, I., H. WASIN, C. ECOBISBON and M.Y. POPOFF. 1995. Roler of the *viaB* locus synthesis, transport and expression of *Salmonella typhi* Vi antigen. *Microbiology* 141: 3039 – 3047.
- VOLTONEN M.V., M. PLOSILA, V.V. VALTONEN and P.H. MAKELA. 1975. Effect of the quality of the lipopolysaccharide on mouse virulence of *Salmonella enteritidis*. *Infect. Immun.* 12: 828 – 832.